

アッセイを始める前に

サンプル作製方法の確認：試薬キットおよびサンプルタイプ毎に用意されている推奨プロトコル(英語版)をご確認ください。各種プロトコルは下記のウェブページよりご覧いただけます。  
<https://acdbio.com/documents/product-documents>

手順の確認：RNAScope™の実験手順を動画で解説しています。実験の様子や流れを事前にご確認ください。  
<https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/rnascope/rnascope-videos-adc.asp>

製品の詳細はこちら

QRコードからも日本語クイックガイドや実験動画をご覧いただけます。

<https://www.cosmobio.co.jp/s/002/>



\* 染色工程には推奨プロトコル(英語版)と異なる部分がございますが、アッセイ結果に影響はございません。

任意	必要品/便利品	備考
<input type="checkbox"/>	染色バット	染色枚数が少ない場合は
<input type="checkbox"/>	スライドガラス用ラック	メーラー (5枚入) でも可
<input type="checkbox"/>	エタノール	新しいものを用意
<input type="checkbox"/>	キシレン	新しいものを用意
<input type="checkbox"/>	蒸留水や超純水	新しいものを用意
<input type="checkbox"/>	温度計	100℃前後の測定が可能なものを推奨
<input type="checkbox"/>	マイクロピペット	試薬分注・滴下
<input type="checkbox"/>	マイクロピペットのチップ	試薬分注・滴下
<input type="checkbox"/>	乾燥機	切片乾燥、ベイキングなど
<input type="checkbox"/>	ドライヤー	切片乾燥
<input type="checkbox"/>	パラフィルム	切片上で試薬が広がりにくい時に
<input type="checkbox"/>	スチーマー/オイルバス/ヒーター付きスターラー等	賦活化液を沸騰させる為 ライドガラスを入れることができればなんでもよい

任意	必要品/便利品	備考
<input type="checkbox"/>	アルミ箔/サラップ等	賦活化液ポイル時の液の蒸発を防ぐ
<input type="checkbox"/>	500ml ビーカー	ヒーターの上で賦活化液をポイルする為
<input type="checkbox"/>	電子レンジ	賦活化液の余熱に利用
<input type="checkbox"/>	ピンセット (大)	ポイル時のスライドラック取り扱い
<input type="checkbox"/>	ピンセット (小)	パラフィルムやカバーガラスの取り扱い
<input type="checkbox"/>	キムタオル/キムワイブ	スライドガラス上の余分な水分を取るため
<input type="checkbox"/>	50ml 遠沈管	試薬原液分注用
<input type="checkbox"/>	1.5 ml チューブ	発色液調製
<input type="checkbox"/>	メスシリンダー	試薬調製
<input type="checkbox"/>	1~3L ボトル	wash buffer 保存用
<input type="checkbox"/>	カバーガラス	
<input type="checkbox"/>	Gill's ヘマトキシリン	Gillを推奨
<input type="checkbox"/>	アンモニア	色出し、ブルーイング (青味を出すため)

固定凍結 (Fixed Frozen)

任意	✓	ステップ	時間	回数	温度	試薬	メモ	装置・器具
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	(灌流) 固定	24時間		4℃	10%NBF又は4%PFA/PBS	必要であれば灌流固定	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	sucrose置換	18時間		4℃	10%Sucrose/PBS	↑24時間の固定が長いと思う様であれば4℃ O/N固定後10% Sucrose/4% PFA/PBSで沈むまで置換も可	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		沈むまで		4℃	20% Sucrose/PBS		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		沈むまで		4℃	30% Sucrose/PBS		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	OCT包埋と凍結	5分			on dry ice Dry Ice & OCT	組織の余分な水分をペーパーで除きドライアイス上のモールドの中でOCTに包埋するブロックを-80℃で保存可能	発泡スチロールボックス
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	薄切			-15~-20℃		推奨は7-15um OCTブロックは少なくとも1時間前に-80℃から出しCryostat内部の温度に慣らしておく	Cryostat, microtome
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	乾燥	1-2時間		-20℃		薄切後のスライドガラスはcryostatの中で乾燥	Cryostat
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	~3か月		-80℃		乾燥後の薄切スライドは-80℃で3か月保存可能	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	洗浄	5分		室温	PBS	ラックを上下に動かしOCTを洗い流す	染色バット、金属ラック等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ベイキング	30分		60℃		切片の剥離防止に有効	ハイブリオープン/ 乾燥機等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	後固定	1時間		室温	10%NBF又は4%PFA/PBS	この後細胞内部が各試薬に暴露される為再固定する	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50%エタノール	5分		室温	50%エタノール	部分的に剥がれてたり切片にしわが寄っていないか確認 試薬は新しいものを使用する	染色バット、金属ラック等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	70%エタノール	5分		室温	70%エタノール		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	100% エタノール	5分	x2	室温	100% エタノール		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	乾燥	5分		室温		切片の剥離防止に有効	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	* ベイキング	~30分		60℃		切片の剥離防止に有効	ハイブリオープン/ 乾燥機等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	過酸化水素 (H2O2)	10分		室温	Hydrogen Peroxide	内在性ペルオキシダーゼ (POD) の失活 H2O2が切片上で拡がりにくい可能性がある	マイクロピペットのチップ/ カバーガラス/パラフィルム等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	洗浄	上下3-5回	x2	室温	蒸留水~超純水		染色バット、金属ラック等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	賦活化液によるポイル	5分		98~102℃	1X Target Retrieval Buffer	一旦温度が下がるので、再度温度が上がってから時間を測る事 目安: 500mlビーカーでポイル⇒350ml準備 <条件検討: 反応時間>	スチーマー/オイルバス/ ヒーター付きスターラー等 アルミ箔/サラップ等、 500mlビーカー、温度計、ピンセット
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	洗浄	上下3-5回	x2	室温	蒸留水~超純水	切片の剥離やダメージの程度を確認	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	100% エタノール	3分		室温	100% エタノール	脱水	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	乾燥	5分		室温		室温やドライヤーなど、任意の方法で	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	* ベイキング	~30分		60℃		切片の剥離防止に有効	ハイブリオープン/ 乾燥機等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	疎水バリア作成	5分		室温	ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	指定のペン以外ではインクが溶けやすい	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	~0/N		室温		インクが乾くまで~オーバーナイト (0/N)	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	プロテアーゼ処理	~30分		40℃	Protease Plus (発色キット) Protease III (蛍光キット、BaseScope)	<条件検討: 反応時間、温度、プロテアーゼの種類> 並行してブロープのプレヒート (40℃、15分)	ハイブリオープン、 専用トレイ、専用スライドホルダー ※プロテアーゼを拡げにくいとき、 マイクロピペットのチップ/ カバーガラス/パラフィルム等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	洗浄	上下3-5回	x2	室温	蒸留水~超純水	切片の剥離やダメージの程度を確認	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ハイブリダイゼーション	2時間		40℃	各ブロープ	洗浄バリア作成 蒸留水や超純水で50倍希釈 希釈前に析出の有無を確認、数か月保存可能	ハイブリオープン バッファー保存のためのボトル、 1~2mlメスシリンダー、 デイスポの50ml遠沈管やピペット等
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	洗浄	2分		室温	1 x wash buffer		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	0/N		室温	5xSSC	20X SSC (saline Sodium Citrate) バッファー 蒸留水もしくは超純水800mlに NaCl: 175.3 g + クエン酸ナトリウム: 88.2 g ⇒1M HClで滴下してpH 7.0に調整 ⇒水で1 Lまでメスアップ ⇒オートクレーブで滅菌	染色バット、金属ラック等
						↑	BaseScope試薬	

BaseScope™ Duplex

✓	ステップ	時間	回数	温度	試薬	メモ	装置・器具
□	洗浄	2分		室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	【スライド洗浄】 染色バットと金属ラック
□	AMP1	30分		40℃	AMP1		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	【洗浄液を吸い取る】 綿棒、キムタオルやキムワイブ等
□	AMP2	30分		40℃	AMP2		【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP3	15分		40℃	AMP3		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP4	30分		40℃	AMP4		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP5	30分		40℃	AMP5		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP6	15分		40℃	AMP6		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP7	30分		室温	AMP7	反応時間を延長するとシグナル増強 ＜条件検討：反応時間＞	
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP8	15分		室温	AMP8		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	Fast Red	10分		室温	Fast Red-A Fast Red-B	基質液調整 (RED-A : RED-B = 60:1) 混合後は3-5分以内に使用する	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
□	洗浄	2分		室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	【スライド洗浄】 染色バットと金属ラック
□	AMP9	15分		40℃	AMP9		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	【洗浄液を吸い取る】 綿棒、キムタオルやキムワイブ等
□	AMP10	15分		40℃	AMP10		【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP11	30分		室温	AMP9		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	AMP12	15分		室温	AMP10		
□	洗浄	2分	×2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
□	GREEN	10分		室温	Green-A Green-B	基質液調整 (Green-A : Green-B = 50:1)	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
□	洗浄	5分		室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	【スライド洗浄】 染色バットと金属ラック
□	対比染色	~30秒		室温	50% Gillの ヘマトキシリン	視野が明るく観察しやすいためGillを推奨	染色バット、金属ラック ※ヘマトキシリンが落ちにくいので 専用のものを用意するとよい
□	アンモニア水			室温	0.02% アンモニア	青味を出すため (bluing)、炭酸リチウムも可	
□	洗浄			室温	水道水	流水で洗浄	
□	乾燥	15~ 30分		60℃		エタノール脱水の代わり Fast Redがエタノールに、Greenが水に可溶	乾燥機、オープン
□	風乾	5分		室温			
□	キシレン	~2秒		室温	キシレン	封入剤をなじませるため 一瞬だけつけるもしくはたらす	染色バット、金属ラック
□	封入			室温	Vectamount		マイクロピペット、カバーガラス、 キムタオル、マッペ等

